568

All'illustre
Prof. Pio Foà
per reverente omaggio
V. Patella

Clinica Medica Generale della R. Università di Siena
diretta dal Prof. V. Patella

PARTE I.

# La microchimica e lo stato cadaverico dei mononucleati del sangue

PARTE II.

# Protozoi flagellati e corpuscoli di Kurloff-Demel nei mononucleati del sangue della cavia

**Prof. Vincenzo Patella**

**Estratto dalla RIFORMA MEDICA, anno XXIII, num. 8**

NAPOLI
STAB. TIP. DELLA CASA EDITRICE E. PIETROCOLA
SUCCESSORE P. A. MOLINA
Via Portamedina alla Pignasecca, 44
1907

Clinica Medica Generale della R. Università di Siena
diretta dal Prof. V. Patella

PARTE I.

# La microchimica e lo stato cadaverico dei mononucleati del sangue

PARTE II.

# Protozoi flagellati e corpuscoli di Kurloff-Demel nei mononucleati del sangue della cavia

Prof. Vincenzo Patella

Estratto dalla RIFORMA MEDICA, anno XXIII, num. 8

NAPOLI
STAB. TIP. DELLA CASA EDITRICE E. PIETROCOLA
SUCCESSORE P. A. MOLINA
Via Portamedina alla Pignasecca, 44
1907

PARTE I. Alla vigilia di pubblicare la II. parte delle mie indagini relative alla genesi endoteliale dei mononucleati del sangue, non essendo possibile dare a queste quella diffusione che si raggiunge in un periodico, così profitto dell' ospitalità cortese della *Riforma Medica* per far conoscere ai suoi lettori i risultati delle mie ricerche di questi ultimi mesi.

Non voglio qui ripetere quanto affermai più volte circa il valore delle obiezioni mosse dal Dott. Ferrata alla mia teoria. Dirò solo che queste, in massima parte, prendono punto di partenza da due errori fondamentali:

I. Dalla ammissione di un vero reticolo (basicromatico) in nuclei allo stato di riposo.

II. Dalla pretesa di avere nel sangue disteso sul vetrino, i mononucleati con quelle identiche, fini, particolarità strutturali, ad essi intrinseche quando sono entro il sangue.

Nel mio nuovo lavoro documenterò con nitidi fotogrammi la realtà di questi due errori.

Se il D. Ferrata si fosse data la pena di consultare l' esteso capitolo di Schmaus ed Albrecht sulla patologia della cellula avrebbe visto che la sua constatazione (reticolo basicromatico nei mononucleati), fulcro per la sua confutazione della mia teoria, trova una interpretazione opposta a quella da Lui data a tale reticolo.

Il reticolo basicromatico dei mononucleati, per quelli che lo hanno, è netto indice del loro stato degenerativo.

Qui affermo che fu sempre lungi da me il pensiero di attribuire della malafede al D.r Ferrata, asserendo che il reticolo nei suoi disegni per i nuclei dei mononucleati, esistente, secondo Lui, in tutti essi, è ben lontano dal costituire la totalità delle imagini di tali nuclei. Ciò affermai nel *Tommasi* del passato settembre, promettendo

che avrei documentato il mio asserto con nitidi fotogrammi. E questi che, nel lavoro di prossima pubblicazione, potranno esser veduti e considerati con maggior calma di quella che si possa richiedere per osservazioni di tal genere, fatte negli intermezzi di un Congresso, mostreranno che i disegni del Ferrata riguardano un solo tipo di struttura nucleare di detti elementi. Tali fotogrammi faranno anche vedere che il reticolo in questione, quando esiste, il più delle volte è ben diverso, per la sua grossolanità e scarsezza, da quello che vedesi nei disegni predetti.

Per dimostrare ancora una volta come i disegni non sempre sieno veridici basta paragonare quelli che presenta Jolly nel manuale di Istologia di Cornil e Ranvier con gli altri della Tavola del suo lavoro « Sui globuli bianchi nella leucemia ». Ambedue questi disegni rappresentano i dettagli della struttura nucleare dei mononucleati, delle più varie grandezze; ma quali differenze si rimarcano, sopratutto per i piccoli, tra i detti dettagli nei due disegni !

In quelli del manuale i fili di cromatina, congiungenti i blocchi di cromatina (punti nodali, secondo Jolly) sono marcati, nettamente distinguibili, talora piuttosto grossi, e ciò in tutte le grandezze dei mononucleati. Nei disegni della tavola predetta il più spesso sono assenti o poco visibili tali fili di cromatina, mentre invece i blocchi di questa, sopratutto nei piccoli elementi, sono molto più grossolani e molto più numerosi (perfino 18 in un piccolo mononucleato) che negli analoghi elementi disegnati nel surricordato manuale. Causa l' assenza di fili, riunenti tali grossolani blocchi di cromatina, che infarciscono quasi totalmente il nucleo, questi appariscono del tutto staccati tra loro. Sono disegni litografati presso a poco nello stesso anno, i quali, dovendo rappresentare gli identici elementi dànno invece per questi delle figure abbastanza diverse.

I disegni del Ferrata per gli identici nuclei sono abbastanza differenti da quelli che Jolly dà per essi.

Come dissi, nella tavola di Jolly il reticolo è più spesso impercettibile, cosicchè nei piccoli mononucleati il nucleo è quasi totalmente costituito da grossolani e numerosi blocchi di cromatina, del tutto isolati. Invece nei di-

segni del Ferrata il reticolo è tanto più evidente, elegante e ricco, quanto più piccolo è il mononucleato e i filamenti cromatinici sono oltremodo spiccati e numerosi, nel mentre che i blocchi di cromatina sono molto meno numerosi e grossolani che nei disegni di Jolly.

Quale valore hanno adunque tali disegni?

Sono forse autoritario, come vuolmi far credere il Ferrata, perchè metto in evidenza ciò che chiunque può controllare? Ma veniamo ad altro.

Il Ferrata interpreta come indice di una attiva secrezione quei corpi rotondi, dalle più varie grandezze, che vedonsi nel plasma dei mononucleati del sangue (anche umano) con la cosidetta colorazione vitale, a mezzo del brillant-cresyl bleu, del rosso neutro. Per ciò, secondo Lui, questi elementi mostrano di essere vivi; anzi secernenti entro il sangue e quindi del tutto erronea la mia teoria, per la quale essi devonsi considerare come cadaveri cellulari. Queste secrezioni identificò il Ferrata ai *plasmosomi* delle cellule ghiandole e perciò li designò *corpi plasmosomici.*

Prima di esporre i fatti che mostrano il reale significato di questi corpi, una semplice considerazione.

Essi si mostrano soltanto nei mononucleati freschi (colorazione vitale), nei fissati (in qualunque maniera) i due predetti colori non ne fanno vedere neppure minime traccie.

I polimorfi nella colorazione vitale non mostrano (in primo tempo) alcunchè di simile ai corpi plasmosomici dei mononucleati, mentre lasciano intravedere le loro specifiche granulazioni, senza colore. Queste invece, veramente secretive, veri prodotti di loro elaborazione, si vedono bene in essi quando fissati. E del pari i plasmosomi delle cellule ghiandolari si vedono bene quando queste fissate, essendo essi, come nei polimorfi, vere secrezioni vitali.

È adunque giustificata la identificazione tra i predetti plasmosomi ed i corpi plasmosomici del Ferrata?

Già sulla base delle suesposte considerazioni parmi di potere rispondere negativamente.

Ma cosa sono questi corpi endoplasmatici?

Con il cresyl-bleu essi si mostrano nei mononucleati come pallottole, di varia grandezza, tinte in bleu. Orbene, guardandoli a foco diverso, si vede che, man mano si

eleva il foco, essi si circondano di un alone porporino, che si ingrandisce man mano che si va perdendo la visione del corpo, finchè al suo posto si vede una areola di un bel colore di porpora.

Ciò a luce intensa, specie se gialla.

Si guardi la soluzione alcoolica di cresyl-bleu, usata per colorare il portaoggetti, attraverso una luce intensa, specie gialla, e si vedrà che la soluzione presenta un magnifico dicroismo: colore porpora intenso a luce diretta, bleu a luce riflessa.

Adunque i cosidetti corpi plasmosomici conservano le proprietà fisiche del colore: il suo dicroismo. Questo fatto molto semplice ha per me grande valore per invalidare la identificazione, compiuta dal Ferrata, tra questi corpi e quelli che Kurloff e Demel trovarono in alcuni mononucleati del sangue di cavia.

In questi, colorati a fresco col cresyl-bleu, è quasi del tutto assente il dicroismo: ciò significa che le loro granulazioni modificano il colore, togliendo a questo una spiccata proprietà fisica.

Ciò sfuggì al Ferrata, il quale anzi nella fig. 42 della II tavola del suo lavoro fece cromolitografare l' effetto ottico del dicroismo del bleu cresyl, colorante i suoi corpi plasmosomici, come se realmente esistesse un anello roseo-viola attorno questi, intensamente tinti in bleu.

Ma cosa sono questi corpi plasmosomici?

Se il Ferrata avesse avuto la costanza di tenere a lungo in osservazione i suoi preparati, nei quali studiò questi corpi, avrebbe costatato dopo 2, 3, 4 ore dei fatti veramente grandiosi.

Mentre in primo tempo, quando più o meno numerosi sono i mononucleati con le pallottole bleu, dicroiche, i polimorfi appariscono del tutto incolori, con fini granuli grigi in un citoplasma rifrangente, dopo 1 1[2, 2, 3 ore essi vengono sempre più a presentare nel loro plasma delle pallottole, di varia grandezza, tinte in bleu, spiccatamente dicroico. In altri termini nei polimorfi compariscono i corpi plasmosomici, identici, identicissimi a quelli dei mononucleati, visti in questi appena iniziata la loro osservazione.

Il fenomeno dopo 4-5 ore è veramente magnifico, im-

ponente, ed è notevole il fatto che nei mononucleati, in questo frattempo, gli analoghi corpi sono del tutto scomparsi.

Ma cosa significa ciò?

Niente altro che, in relazione a questi cosidetti corpi plasmosomici, dal campo della vita dobbiamo passare a quello della morte: dalla biochimica alla necrochimica!

Il polimorfo viene a presentare questi corpi quando comincia a morire. Finchè esso è vivente, per effetto della sua vitalità, riduce a leuco-basi il cresyl bleu e così si presenta scolorato in tutte le sue parti. Quando nel preparato (colorazione vitale), viene a soccombere dopo 1 1[2, 2, 3 ore, dacchè fu tolto dal suo naturale ambiente, allora il cresyl bleu, cessando di essere ridotto, colora le secrezioni che dà il protoplasma morente e queste si mostrano del tutto identiche ai corpi plasmosomici dei mononucleati.

Ciò risponde perfettamente a quanto afferma Verworn, citato da Schmaus ed Albrecht: *essere legge generale per la quale le masse del protoplasma morente hanno la tendenza di appallottolarsi in grumi, prendendo la forma di palle.*

Klemm, citato dai predetti autori, dice che la formazione nel plasma di nodi, di palle, di secrezioni, di precipitazioni sono segni di una morte più o meno lenta delle cellule.

Ecco la ragione per la quale i polimorfi, nei preparati predetti venendo a morire, presentano i magnifici globi, tinti dal cresyl bleu, forniti del dicroismo. Essi sono identicissimi, anche per le loro varie dimensioni, a quelli che nei mononucleati si vedono fino dal primo tempo della osservazione.

Adunque la presenza di tali globi in questi ultimi (e non tutti li presentano nè in primo tempo nè successivamente) attesta chiaramente la mortificazione del loro citoplasma.

Questi globi corrispondono ad una fase di tale mortificazione e così essi cominciano a sparire dai mononucleati presso a poco quando s'inizia la loro comparsa nei polimorfi, che vanno cadaverizzandosi.

E' la chimica della morte che, con le sue leggi fisse e precise, come quelle della biochimica, domina la successione dei fenomeni e così dopo un tempo, più o meno

lungo, durante il quale s'accentuano nei preparati i fatti degenerativi dei polimorfi, anche da questi scompaiono le secrezioni date dal loro plasma, quando stava per morire.

Ciò che costatai col cresyl-bleu-brillant si ripete in modo assolutamente identico nella colorazione col rosso neutro.

Ma, al di fuori di questi fatti, tanto colossali quanto eloquenti, e che solamente la mia tenacia nell' osservazione mi permise di rilevare, quanti altri desunti dalla indagine di questi preparati, in primo, mi avevano indotto a rifiutare la conclusione di Ferrata circa il significato, per queste pallottole, di una funzione vitale del mononucleato entro il sangue, circa la loro identificazione con i plasmosomi delle cellule ghiandolari.

La grandiosità dei fatti suesposti, tanto facili a costatarsi, rende superflua la esposizione di questi ultimi.

Adunque, ciò che, secondo il Ferrata, doveva essere il più netto indice della vita dei mononucleati entro il sangue, in questo attivamente funzionanti, è invece la più nitida espressione del loro stato cadaverico, preagonico entro il sangue.

Il neologismo—*corpi plasmosomici*—creato dal Ferrata per identificare le secrezioni (premortali) di tali elementi con le secrezioni, veramente vitali, delle cellule ghiandolari, non ha diritto all'esistenza!

Prima di esporre altri fatti, che, sempre sulla base della istochimica, m' autorizzano ad affermare in oggi lo stato cadaverico dei mononucleati entro il sangue, devo fare alcune brevi considerazioni allo scopo che non mi si obietti che esiste qualche contradizione nelle mie conclusioni.

I mononucleati con le pallottole tingibili, nella colorazione vitale col cresyl-bleu o col rosso neutro, sono in numero superiore a quelli che, nè in primo tempo, nè successivamente, presentano tali indici del citoplasma loro che sta per morire.

Dunque questi non sono del tutto cadaveri, quali invece vengono considerati dalla mia teoria.

Il fatto esiste, ma può essere interpretato in piena armonia con essa.

Il concetto dello stato di morte dei mononucleati entro il sangue è sopratutto relativo alla funzione statica

che hanno gli endoteli nell'apparato vascolare. Caduti in circolo, sopratutto per ragioni meccaniche, essi si trovano in quel plasma di cui direttamente si nutrivano, quando tappezzanti l'intima.

Le condizioni di loro conservazione entro questo ambiente, naturale per essi, sono certamente le più opportune per mantenere, più o meno a lungo, la vitalità del loro plasma.

Quando si pensa che, come riferiscono Schmaus ed Albrecht, nella morte lenta fisiologica delle cellule (Klemm-Demorr, Bokorny, Loew etc.) la formazione di nodi, di palle, di secrezioni nel plasma ed anco le manifestazioni di soluzione (vacuoli), anche se alquanto sviluppate, spesso influiscono pochissimo sulle manifestazioni vitali delle cellule, si può ben ritenere che i mononucleati, morti del tutto rispettivamente alla funzione statica, possono restare, per un tempo più o meno lungo, entro il sangue, in uno stato che non è vita, che non è morte: ciò sopratutto relativamente al loro citoplasma.

E poichè i grandi mononucleati sono gli emomacrofagi di Metchnikoff, è presumibile che, dato il grande potere fagocitario degli endoteli, quando *in situ*, questi, venendo a cadere nel sangue, ove si tramutano in mononucleati, date le ottime condizioni dell'ambiente in cui si trovano, ripetano dalla conservazione di un certo grado di vita del loro citoplasma l'attitudine fagocitaria.

Il fagocitismo, nella infezione malarica, esercitato dagli endoteli vasali, di tutti i distretti vascolari, ma specie del cervello è veramente spiccato. E ciò in rapporto all'analogo fagocitismo (del pigmento) esercitato, durante l'accesso febbrile, dai grandi e medii mononucleati, e dalle forme di passaggio; fagocitismo che, non domandando, davvero, un'alta attitudine funzionale, può bene essere devoluto alla superstite vita del citoplasma degli endoteli, divenuti mononucleati del sangue.

E quando vediamo che i polimorfi, nella colorazione vitale, restano viventi anche per più ore, sebbene in condizioni tanto diverse da quelle, nelle quali si trovano quando entro il sangue, possiamo bene ritenere che gli endoteli vasali, *distaccatisi sopratutto per ragioni meccaniche*, divenendo mononucleati del sangue, conservino più o meno a lungo, un certo grado di vitalità nel loro

citoplasma. Ma questa vitalità, in ultima analisi, nel più di essi, è la vera espressione di uno stato preagonico. Infatti non pochi non presentano, nè in primo tempo nè successivamente, le pallottole indicanti il citoplasma morente: questi dunque sono già veri cadaveri entro il sangue.

Tutto ciò io ritengo più che sufficiente a mostrare che se la predetta colorazione vitale fa vedere nei mononucleati (sia pure nel più di essi), fin dai primi momenti dell' osservazione, un citoplasma in stato agonico, questo fatto non esclude la loro derivazione dagli endoteli vasali.

Ed a dimostrare che la mia non è una semplice ipotesi, basta usare la colorazione, cosidetta vitale, al cresyl-brillant-bleu per gli elementi di un essudato. Appena estratta una certa quantità di liquido in un caso di pleurite, la si metta in un matraccio (sterilizzato) con entro delle pallottoline di vetro, per impedirne la coagulazione. Centrifugata una parte dell'essudato, si metta una goccia del sedimento nel coprioggetti e questo si applichi sul portaoggetti, sul quale fu stesa la soluzione alcoolica di cresyl-bleu.

I cosidetti linfociti di tali essudati, nonchè gli elementi mononucleati si presentano, già in primissimo tempo dalla osservazione, tinti in celeste bleu, più carico nel nucleo.

Fatto questo che dimostra, secondo le constatazioni di Ehrlich e secondo quanto esposi sopra circa il comportamento dei polimorfi (veramente viventi) verso la colorazione predetta, che tali elementi dell'essudato sono realmente morti. In onta di ciò in non pochi di essi si vedono 1-2-3 piccoli globicini intensamente bleu, sensibilmente dicroici, simili, a parte la loro grandezza e numero, a quelli che si vedono nei mononucleati del sangue. E tali indici di un piccolo residuo di una debole vitalità chimica in qualche parte del plasma di tali elementi si vedono esclusivamente in quelli che mostrano integro lo scarso citoplasma. Ed in questo essudato quando presenti i polimorfi, si vedono essi, o subito all' inizio della osservazione o dopo pochi minuti (10-15-20 e più), infarciti dei tipici blocchi rotondi, altamente dicroici, mentre il loro nucleo è spiccatamente colorato in celeste bleu. In questi essudati i polimorfi, nel quale esistono da

tempo più o meno lungo, anticipano di 1-2 ore i segni della loro morte, essendo ovvio ritenere che, arrivati nell'essudato, andavano, lentamente si, ma progressivamente degenerando. E se in questi essudati esistono dei grandi mononucleati, nel loro citoplasma si vedono 1-2 piccoli ammassi di blocchicini bleu dicroici. Si riesamini ad ogni 4-6 ore l'essudato, rimasto alla temperatura della stanza nel matracio, centrifugandone una piccola quantità, volta per volta, e si vedrà che dopo 12-24-36 ore sono andati diminuendo gli elementi, *che si sono fatti tutti piccoli*, che presentano i granuli bleu. E nel frattempo i polimorfi, dei quali molti cadaveri si vedono scolorati e rigonfi, dopo essersi anche presentati con una sola parte del loro citoplasma fornito dei rotondi blocchi bleu-dicroico, vengono a perdere la proprietà di elaborarli e si mostrano intensamente tinti, specie nel nucleo, in bleu, ciò perchè essi sono definitivamente morti.

Adunque gli elementi di questo essudato, sebbene ad una temperatura (+ 16°) molto inferiore a quella del torace in cui trovavansi, continuano a conservare, perfino dopo 40-50 ore, dei minimi residui di attività chimica in qualche parte del loro citoplasma. E ciò in onta che, come è lecito e facile ritenere, essi, qualunque ne sia l'origine (ematica o pleurica), da non poco tempo fossero presenti nell' essudato. Ma in questo essi trovavano le più opportune condizioni per la conservazione della predetta attività, la quale, sempre più riducendosi nella scarsa sua manifestazione, si mantenne, in taluni di essi, per oltre 50 ore nell' essudato *in vitro*.

Questa semplice esperienza lumeggia bene la conservazione, anche durevole, negli endoteli vasali, sfaldatisi e divenuti mononucleati del sangue, di quelle proprietà chimiche, che sono i più netti indici di un citoplasma morente. Questi appunto sono rappresentati dalle pallottole, più o meno grandi e numerose, che nella colorazione cosidetta vitale del sangue (col cresyl brillant bleu e col rosso neutro) vedonsi in non pochi di essi fino dai primi momenti dell' osservazione.

La idoneità delle condizioni fisiche e chimiche del sangue per tale conservazione è infinitamente superiore a quella degli essudati sierosi, in *vivo ed in vitro*.

Tutto ciò prova chiaramente che i mononucleati del

sangue, in onta che molti di essi presentino il protoplasma vivente, ma agonico, sono da considerarsi come cadaveri cellulari entro il sangue.

Venendo ora alle altre mie costatazioni, dimostranti che, entro il sangue, il plasma dei mononucleati è, nel più di essi, intensamente degenerato (premorto) e negli altri del tutto cadaverico, dirò che esse non mi derivano da un reperto accidentale ma da ricerche ragionate.

In qualche caso di grave infezione tifica, avendo colorato il sangue, previa fissazione col calore, con la miscela di Pappenheim (1) vidi che qualche polimorfo presentava la specifica reazione di Pappenheim, mostrando il citoplasma tinto in rosso con granuli rubinorossi. In altri termini questi polimorfi, offrenti segni di grave degenerazione, si mostravano identici ai mononucleati presenti sullo stesso preparato per ciò che riguarda la predetta reazione. Ciò pure vidi, non rare volte, in taluni polimorfi, in preda a degenerazione, esistenti in essudati pleurici, ricchi di linfociti, molti dei quali presentavano la predetta reazione.

Considerando che degenerazione del citoplasma significa, il più delle volte, sua coagulazione, volli vedere come si comportassero, verso la miscela di Pappenheim, le albumine del plasma sanguigno (essudato, transudato), quando coagulate.

In una provetta con 10-15 $cm^3$ di essudato (pleurico) si istillino 2-3 gocce di detta miscela, agitando acciò si distribuiscano bene nel liquido. Questo si presenta con un bel colore celeste-bleu, che è la diluzione di quello della miscela. Tale colore nella provetta persiste immutato molto a lungo. Si sottoponga alla fiamma la metà superiore del liquido e si vedrà che quando si inizia la coagulazione il colore bleu celeste è rapidamente sostituito da un colore roseo, che si fa roseo-rubino quando vien tolta la provetta dalla fiamma e tale perdura per più giorni. Insisto perchè non si ecceda nell' unire ai liquidi albuminoidi in esperimento la miscela: non più di 2-3 piccole gocce.

---

(1) Avverto che in tutte le mie ricerche mi valsi sempre della miscela composta di pasti uguali di soluzione acquosa satura di pironina e di verde di metile.

In mancanza di essudato o transudato serve egualmente bene l' albume d' uovo, di cui poca quantità si sbatte bene in una provetta con 10-15 grammi di acqua.

Adunque l' albumina coagulandosi modifica intensamente il colore della miscela Pappenheim con una reazione veramente magnifica.

E ciò non è dovuto affatto al calore, perchè coagulando, col calore, il liquido albuminoso, lasciandolo raffreddare, stillando 1-2 gocce della miscela sui coaguli, che è bene sminuzzare sbattendo la provetta che li contiene, la reazione, sebbene un pò più tarda, si presenta evidente.

Avevo dunque ben ragione di ritenere che i predetti polimorfi, presentanti quella colorazione, che, data dalla sua miscela, Pappenheim ritiene specifica per i mononucleati, mi offrivano questa esclusivamente per ciò che le sostanze albuminoidi del loro citoplasma erano in essi, essendo degenerati, in uno stato di coagulazione.

Conseguenza immediata, veramente naturale, di questa costatazione è che anco i mononucleati abbiano tutti il citoplasma degenerato. È ben noto che in essi, quanto più sono piccoli, tanto più evidente è la reazione, ciò attestando in questi la maggiore intensità della degenerazione (picnotica).

Nei preparati di sangue fissati con le miscele osmiche (Hermann, Flemming), col formolo, la reazione Pappenheim, come si vedrà in seguito, manca del tutto nei mononucleati.

Orbene, ai predetti liquidi albuminosi si aggiunga una certa quantità dei predetti fissatori (uno per volta) e si uniscano ad essi 2-3 gocce della miscela Pappenheim, si riscaldi finchè si vuole, fino all'ebollizione, ma il colore bleu-celeste resta immodificato (1).

Armonia veramente eccezionale nei risultati della macro- e della microchimica!

I più abituali fissatori tolgono la proprietà all' albumina coagulata di tramutare in roseo-rosso, in rosso ru-

---

(1) Usando il Flemming il giallo dell'acido cromico dà un colore verdiccio col bleu della miscela: preferibile quindi di osservare il fenomeno col liquido di Hermann, ma sopratutto col formolo al 10-20 %.

bino il colore bleu intenso del liquido di Pappenheim. Essi ed i loro componenti, saggiati isolatamente, non esercitano qualsiasi influenza sul colore del liquido di Pappenheim, astrazione facendo dal Flemming, che col giallo dell'acido cromico tramuta in verde il bleu del liquido predetto. Molte sostanze dispiegano questa azione inibitrice. Così si spiega la mancanza della reazione da parte dell' albumina dell' orina, la cui complessa composizione chimica vale a spiegare tale inibizione, la quale può essere data da sostanze chimiche non molto attive, come ad esempio dall' acido picrico nel reattivo di Esbach.

L' alcool, pur essendo tanto ottimo fissatore, ritarda soltanto la reazione, nei predetti liquidi, rendendola un po' meno spiccata ed elegante. E ciò è in pieno accordo a quanto si costata nel sangue che, fissato con l' alcool assoluto, mostra abbastanza bene la reazione Pappenheim nei mononucleati.

Il sublimato (1 $^{0}/_{00}$) ostacola la reazione molto meno del formolo, delle miscele osmiche, ma molto più dello alcool.

Ma, cosa molto importante a sapersi, questa reazione che posso dire specifica delle albumine coagulate, *manca del tutto nei nucleo-proteidi.*

Preparatami dal mio aiuto Dott. Mancini una certa quantità di nucleo-proteide del pancreas, col metodo Hammarsten; avuta dalla gentilezza del Prof. Centanni della caseina purissima, sospesi l' uno e l' altra nell'acqua ed aggiuntevi 2-3 gocce del liquido Pappenheim, anche dopo l' ebollizione, il colore si mantenne bleu-celeste. La caseina, contenendo un gruppo fosforato, si comportò come i proteidi del nucleo (1).

E così l' armonia, veramente grande, tra la macro- e la microchimica, fa vedere che i nuclei dei mononucleati trattati con la miscela Pappenheim, assumono il colore di questa, più o meno intenso secondo la loro grandezza.

---

(1) Per non dilungarmi troppo non riporto i risultati delle mie ricerche fatte a tale proposito sul latte. Questo non dà la reazione Pappenheim che in quelle proporzioni che sono relative alla quantità della latto-albumina.

Ben presto si vedrà come l'albumina del nucleo (succo nucleare) ci venga rivelata negli elementi degenerati, morti, dalla specifica reazione delle albumine coagulate.

Reiterate prove, spesso compiute alla presenza di taluni colleghi della facoltà, mi diedero sempre risultati conformi ai suesposti.

Questi mi autorizzano ad affermare, in oggi, che la reazione Pappenheim nei mononucleati del sangue indica che il loro citoplasma è alterato, avendo questo le sue albumine coagulate, e quindi che esso, non di raro, si trova in un vero stato cadaverico, proprio entro il sangue.

Ma quali altri fatti appoggiano queste mie conclusioni? Altri due che non esito a ritenere forniti di eccezionale importanza.

I. Si prende un pezzo di fegato di una cavia appena uccisa: lo si taglia in pezzettini che si mettono in una capsula (Petri), ove si lasciano alla temperatura dell' ambiente (+ 16°-18°). Dopo 24 ore, ma meglio dopo 48, si striscia su un portaoggetti un pezzettino del fegato, dapprima spappolato, lo si colora, dopo asciugato all' aria, senza fissazione, colla miscela Pappenheim (15″-20″), lo si lava bene bene con l' acqua e lo si asciuga con la carta bibula, esercitando un po' di pressione per asportare i frustoli più grossi. Montato il preparato col balsamo Canadà in xilolo, esso ci fa vedere nel citoplasma delle cellule epatiche la reazione di Pappenheim così intensa, così bella, quale mai si costata nel citoplasma dei mononucleati del sangue.

Citoplasma roseo-roseo, rosso-rubino, con un numero rilevante di granuli rubino-rosso brillante.

Non si potrà mica dubitare che queste cellule epatiche siano realmente morte!

Si fissino un pò a lungo, da 2 a 4 ore (1) i preparati (formolo, Hermann, Flemming) ottenuti con lo stri-

---

(1) La fissazione di tali preparati, in relazione agli obietti di queste indagini, riesce non sempre bene ed uguale nei singoli elementi. Qualche volta bastarono 60 m'. per dare la scomparsa della reazione nei preparati fissati, altre volte il fenomeno fu solo evidente dopo 2-3 ore di fissazione. Per quella col Flemming occorre lavare molto a lungo il preparato con acqua corrente.

sciamento della polpa epatica, e si vedrà che, colorati per 30″ con la miscela (1) Pappenheim, in essi le cellule non presentano più la specifica reazione, che si vide tanto bella e spiccata nei non fissati. Ove le cellule sono isolate mostrandosi spesso meno influenzate dai fissatori, il loro citoplasma è diventato roseo-violaceo e le sue granulazioni e quelle che inquinano, abbondanti, il campo microscopico hanno perduto il tono rubino - brillante. Ove si vedono dei frustolini di tessuto, le cellule mostrando di essere fissate molto meglio di quelle isolate fanno vedere il loro citoplasma, che tende a farsi omogeneo, celeste-viola o celeste bleu e si mostrano spesso molto bene individualizzate.

Qui segnalo, per incidenza, che in questi preparati si vedono dei reticoli nucleari (basicromatici), talora belli, per quanto meno ricchi, come quelli che il Ferrata fece disegnare per i nuclei di tutti i mononucleati. Ed in tali preparati il tipo nucleare (reticolo degenerativo) è abbastanza uniforme, perchè tutti gli elementi si trovano presso a poco in un uguale stadio di degenerazione.

Non furono certo fissati viventi questi nuclei, che presentano tali reticoli!

Nei preparati di fegato non fissati e colorati con la miscela di Pappenheim si vedono, spesso, entro il nucleo delle cellule 2-3 ed anco 4 piccoli globi tinti in un bel rubino brillante. Questi a prima giunta si direbbero nucleoli: ma non sono tali. Essi sono dati dall' albumina contenuta nel nucleo (succo nucleare), che si è appallottolata durante o dopo la morte di questo e come quella del citoplasma, essendo coagulata, presenta magnifica la reazione rosso-rubino.

Spesso in luogo delle pallottole, arieggianti dei nucleoli, si vedono entro il nucleo dei blocchicini più o meno regolari, delle figure anelliformi, triangolari o quadrangolari, dei filamenti più o meno lunghi e grossi, tinti in rubino rosso.

---

(1) I preparati fissati col Flemming, che devono essere lavati in acqua corrente molto a lungo, sono un pò refrattari alla colorazione e quindi l' azione della miscela deve durare 40″-60″ ed anche più.

La miscela Pappenheim, ottimo rivelatore, veramente specifico, dell'albumina coagulata, disvela quella (coagulata) del nucleo, mentre, in armonia con quanto si vide nella provetta, i proteidi dello stesso nucleo non reagiscono affatto alla miscela di cui prendono il colore senza modificarlo.

Ed anco questi globicini, con parvenza di nucleoli, nei preparati di cellule epatiche, fissate coi predetti agenti, perdono per effetto della fissazione la energica proprietà di cambiare in rosso-rubino il bleu della miscela Pappenheim. Essi anzi la perdono più prontamente e totalmente che il citoplasma.

Il fenomeno della reazione Pappenheim negli elementi morti si può osservare nel fegato di cadaveri umani specie se la morte ebbe luogo per infezione (tifo, polmonite).

Questa colorazione di preparati di fegato, fatti per strisciamento, ci fa vedere le gravi alterazioni delle quali sono in preda le rispettive cellule, nel mentre ci presenta veramente bella la specifica reazione del citoplasma, divenuto roseo e tutto infarcito di granuli, più o meno grandi e numerosi, tinti in rosso-rubino.

La fissazione, a mezzo dei predetti agenti, oltre che far scomparire o ridurre la predetta reazione, maschera molti altri fatti, altamente degenerativi rivelatici dal liquido di Pappenheim sui preparati non fissati.

In un caso di fegato altamente infettivo (tifo) paragonando i preparati tinti col liquido Pappenheim, prima e dopo la fissazione, nel protocollo delle osservazioni scrissi: le cellule sembrano rigenerate. In quelli fissati, specie col formolo, non più grandi cellule, non più citoplasma roseo intenso, non più grossolane e numerose granulazioni rosso-rubino come nei non fissati, ma cellule coartate, con plasma omogeneo celeste intenso e nucleo colorato in bleu.

Pezzettini di fegato della cavia (48 ore in capsula) e di individui morti per infezioni, messi a lungo contatto coi detti fissativi (da 4 a più ore) e molto lavati, sopratutto quelli fissati con Flemming, fanno vedere quanto si costatò nel tessuto strisciato sul porta-oggetti.

Molte cellule di questi pezzettini sono del tutto irriconoscibili se paragonate a quelle non fissate, ambedue

colorate dal P a p p e n h e i m, mostrandosi come reintegrate, col citoplasma omogeneo a contorno regolare colorato in celeste più o meno intenso.

Se si continua a ricercare la reazione P a p p e n h e i m nel fegato, lasciato sempre nella capsula, si vede che viene a scomparire dopo 80 ore. Nei preparati fatti con questo fegato, che è divenuto come gommoso, non fissati e colorati colla solita miscela, si vedono in gran parte scomparsi i nuclei ed i superstiti, fattisi omogenei, sono debolmente tinti in celeste. Il citoplasma è divenuto del pari omogeneo, senza granulazioni e si mostra tinto in roseo-viola.

Ciò dimostra bene che la reazione corrisponde ad un periodo della degenerazione citoplasmatica. Così appunto nei fegati (infettivi), molto alterati per la infezione o per i fatti cadaverici, è ben difficile averla con quella magnifica evidenza, che è presente nelle cellule meno degenerate.

E ciò è in completa armonia con quanto si vede per l'albumina degli essudati, la quale, quando comincia la loro decomposizione, perde gradatamente l' attitudine a dare la reazione di P a p p e n h e i m.

Questa adunque corrisponde proprio ad un periodo della degenerazione citoplasmatica e così si interpreta il fatto che non in tutti i mononucleati del sangue essa è presente od è ugualmente intensa od ugualmente distribuita in tutto il loro citoplasma.

Quelli che non mostrano tale reazione hanno uno stato degenerativo del citoplasma che va al di là di quanto è necessario per produrla.

I mononucleati del sangue non fissati ed asciugati all' aria, e fissati a + 120° colorati col P a p p e n h e i m (20″, 30″ m.) presentano abbastanza di frequente specie i piccoli entro i nuclei uno o due di quei blocchi lisci rotondi anelliformi rubino-rosso che tanto spiccati si mostrano nelle cellule epatiche (cavia) degenerate per la permanenza nella capsula (24 a 50 ore).

E questi testimoni dell'albumina, coagulata, del succo nucleare si mostrano con le stesse immagini che si osservano nelle predette cellule epatiche, e tali si vedono parimente in tutte le grandezze dei mononucleati, ed anco nelle forme di passaggio.

Il fenomeno è sopratutto evidente attuando la cosi-

detta colorazione vitale del sangue a mezzo della miscela di Pappenheim.

Gli elementi degli essudati e trasudati presentano spesso la reazione di Pappenheim, siano essi piccoli (cosidetti linfociti) o grandi. Sieno essi grandi e riuniti a lembi, così da dimostrare (mi riferisco ai trasudati) la loro esclusiva derivazione da sfaldamento pleurico, quando non fissati o fissati col calore molto spesso presentano tale reazione, visibile non di raro anche nell'albumina del loro nucleo. Perciò essi fanno talora vedere quei blocchetti rosso-rubino, che tanto di frequente si constata nei mononucleati del sangue, specie nei piccoli, ma sopratutto nelle predette cellule epatiche, con parvenza di nucleoli. Ma non tutti gli elementi degli essudati o trasudati dimostrano tale reazione, anzi non di raro anche i piccoli ne sono privi e ciò perchè trovansi al di là di quel periodo della degenerazione, che dà all' albumina del loro citoplasma, perchè coagulata, la proprietà di cambiare il colore del liquido di Pappenheim. E così appunto in tali elementi il plasma può essere del tutto assente, significando ciò il massimo della loro degenerazione.

E così mononucleati del sangue, mononucleati grandi e piccoli degli essudati e trasudati (anche se i primi disposti a lembo), cellule epatiche cadaveriche, in autolisi), vengono ad avere caratteri comuni, sono cioè identificati dalla reazione di Pappenheim, indicante che in essi tutti l' albumina del loro protoplasma, degenerato, è coagulata.

L' armonia che lega i risultati della micro- e macrochimica è veramente spiccata. Come i fissatori suaccennati inibiscono la reazione Pappenheim nelle albumine coagulate degli essudati e trasudati, nelle albumine d'uovo, così essi la inibiscono in tutti i predetti elementi.

Quella reazione veramente elegante, tanto spiccata in essi specie se fissati col calore, sopratutto nei piccoli mononucleati, viene a mancare se su tali elementi si fecero agire i fissatori.

Si lascino così per un tempo un pò lungo (30″-40″) dei preparati di sangue, di essudato o trasudato, asciugati all' aria, e dopo un lungo lavaggio (circa il doppio della durata della fissazione) in acqua corrente, si colo-

rino, appena tolti dall' acqua di lavaggio, anche un pò a lungo (40″-60″) colla miscela di Pappenheim.

I risultati più belli si ottengono sopratutto col formolo, poi col Flemming, indi con l' Hermann.

In tali preparati si vede che, specie nei piccoli, ove era tanto spiccato, manca il rosso-rubino del contorno citoplasmatico. E sopratutto col Flemming l'orlino citoplasmatico, che nei piccoli mononucleati del sangue fissato al calore, era infarcito di blocchicini rosso-rubino si presenta omogeneo talora tinto in celeste cielo; e lo stesso si vede nei medi e nei grandi, col formolo, con l' Hermann il citoplasma non solo non è più roseo, etc., ma spesso in tutti questi elementi, si presenta violaceo, viola celeste. L' albumina coagulata di tutti essi, non più atta, dopo l'azione dei predetti fissatori a cambiare il bleu delle miscele Pappenheim in roseo etc. assume più o meno pura, perfino la tinta di questa.

Nè più nè meno di quanto, come dissi sopra, ha luogo per le cellule epatiche in completo stato cadaverico.

Risultati tutti questi che armonizzano tanto spiccatamente con quelli che vedemmo esplicarsi nella provetta, per le albumine degli essudati e trasudati, prima e dopo che su esse abbiano agito questi fissatori.

II. A dimostrare che è proprio il citoplasma degenerato, che è proprio la sua albumina coagulantesi che tramuta il bleu della miscela Pappenheim in rosso-rubino, si faccia la seguente ricerca:

Si mettono su un portaoggetti due o tre gocce della predetta miscela (composta in parti uguali di soluzione alcoolica satura—anzichè acquosa—di pironina e di verde di metile) e si lasciano evaporare movendo il vetro cosicchè su esso resti uno strato uniforme di colore piuttosto intenso.

Messa sopra tale portaoggetti la piccola goccia di sangue raccolto sul coprioggetti, ed esercitata su questo una lieve pressione per distendere la gocciolina, osservando tosto il preparato si vede che nei mononucleati è presente la specifica reazione.

Questa è tanto più spiccata, quanto più piccolo l' elemento, il cui nucleo celeste è circondato da un alone più o meno serrato intorno ad esso di tozze granulazioni di un magnifico rosso-rubino. Nei mononucleati medi e

grandi, il plasma roseo tanto più pallido quanto più grande è l'elemento, presenta, specie alla periferia dei granuli piuttosto fini, rosso-rubino.

All' intorno del loro nucleo vedonsi quelle particolarità delle quali mi occupai sopra, attestanti la coagulazione del succo nucleare, le cui parti raccoltesi in ammassi presentano il colore rosso-rubino. Si noti che non di raro si trova qualche piccolo mononucleato col suo orlo citoplasmatico celeste, anzichè rosso-rubino.

I polimorfi in tale periodo di osservazione appariscono del tutto incolori: nello spessore del citoplasma si intravedono, come punti grigi lucenti, le loro specifiche granulazioni.

Si smetta l'osservazione, e la si riprenda, avendo o no paraffinato i bordi del coprioggetti, dopo 2-3-4 ore e si vedrà che taluni polimorfi, presentando il nucleo tinto in celeste, mostrano il plasma roseo con granulazioni rosso-rubino. Dopo 6-8-12 e più ore si constata che il citoplasma dei polimorfi ha acquistato una tinta rubino-rosso, rubino-porpora, veramente magnifica, e presentano spesso, essendo meno acceso il suo colore rosso-rubino, una ricca quantità di granuli rosso-rubino brillanti.

E nel loro nucleo si vedono talora i blocchicini rubini, descritti per i mononucleati del sangue, per i cosidetti linfociti degli essudati, dei trasudati, per le cellule epatiche degenerate.

Il fenomeno cui si assiste è veramente bello e lo si constata anche dopo 24 ore; di rado più al di là, perchè allora si osserva un altro fenomeno.

Man mano che i polimorfi vanno acquistando la reazione Pappenheim, gigantesca, in causa del loro spessore, rispettivamente a quella offerta dai mononucleati (tanto sottili), la quale è veramente spiccata solo nei piccoli, vediamo che in tali elementi essa va gradatamente dileguandosi.

Riesaminando degli elementi che la presentavano intensa, dopo 16-20-24 ore, si vede che il loro citoplasma roseo intenso infarcito di molti granuli rosso-rubino è divenuto celeste-roseo sporco o celeste.

I piccoli mononucleati sono quelli che più a lungo conservano la reazione, ma a lungo andare (30 o più ore) essi pure ne restano privi e vengono a presentarsi con

l'alone citoplasmatico celeste-grigio, celeste-viola. Ed uguale sorte tocca ai polimorfi il cui plasma dopo 30-40 ore perde il colore rosso che è sostituito da una tinta celeste-grigio, celeste-viola. Cosa significa ciò?

È facile comprendere che i polimorfi vengono a morire dopo 6-8 ore dacchè si trovano entro il preparato, ed il loro protoplasma degenerando, coagulandosi, cambiano in rosso il bleu della miscela Pappenheim, che essi, finchè vivevano, tenevano ridotta allo stato di leucobasi, come lo cambiano le cellule epatiche morte da 2-3 giorni.

Ora se la reazione di Pappenheim si costata nei mononucleati del sangue fino dal primistino tempo della colorazione vitale, ed i polimorfi vivi non l'assumono e solo vengono ad averla quando sono morti, è conclusione ben logica che i mononucleati si trovino nel sangue in un vero stato cadaverico.

È la grande armonia dei fatti che si costata in queste osservazioni.

Non del tutto rari sono i piccoli mononucleati del sangue che, fino dal 1° tempo della osservazione, non presentano la reazione Pappenheim e tanto meno la presentano in seguito.

Questa reazione, come dissi, corrisponde ad un periodo della degenerazione citoplasmatica, ed i predetti mononucleati non la presentano perchè la loro degenerazione è al di là di tale periodo. E quelli che la presentano in 1° tempo, dopo un lasso di tempo, più o meno lungo, la perdono, perchè si alterano sempre più restando nel preparato. Ed eguale sorte tocca ai polimorfi.

E' una alacre microchimica, della quale vediamo tutto lo svolgimento dei suoi atti sotto la lente del microscopio; atti che ci attestano le varie fasi della degenerazione di tutti questi elementi.

L'albumina coagulata che cambia in rosso o in rosso-rubino il bleu della miscela di Pappenheim, quando si altera ancora più si perde questa sua energica, specifica proprietà, ed il rosso in tal caso è sostituito da un celeste bleu; ricompare cioè più o meno puro ed intenso il colore della predetta miscela.

L'armonia di tutti questi risultati viene affermata da quelli suesposti, attinenti alla reazione Pappenheim

negli elementi dei trasudati ed essudati, sopratutto se questi risultati vengono messi in raffronto con quelli che si osservano colorando col metodo della colorazione vitale (cresyl-bleu brillant) il loro sedimento centrifugato.

In tali ricerche si vide che i cosidetti linfociti hanno qualche piccolo tratto di protoplasma ancora agonizzante e che taluni polimorfi presentano, anche in primo tempo le pallottole tinte in bleu dicroico, attestanti che, per essere immigrati da qualche tempo nell'essudato, sono sulla via della cadaverizzazione. I polimorfi in tali essudati vengono a presentare molto più presto, che nel sangue, i globi predetti, indici della morte che si effettua nel loro citoplasma, e molto più presto che nel sangue vengono a presentare la reazione Pappenheim che può essere talora presente fin dal 1° tempo della colorazione : e questo significa la loro definitiva morte.

Armonia di fatti che si seguono durante la loro evoluzione nella indagine microscopica, la quale è ribadita dalla eguaglianza dei risultati che si costatano nel preparato e nella provetta : dei risultati cioè della macro- e della microchimica.

Tutto ciò dimostrando che i mononucleati dentro il sangue trovansi in uno stato, che si può dire cadaverico, si comprende bene quale sia il valore della teoria di Pappenheim, che si basa quasi esclusivamente sui risultati di una osservazione.

Ma questa teoria non ha dato che non sia stato vigorosamente investito, e, come dissi nel mio lavoro dello scorso anno, Turk, la combatte nei suoi più essenziali momenti. In esso dimostrai che lo studio degli elementi degli essudati, dei trasudati, degli endoteli degenerati, offrenti tutti la reazione Pappenheim, per vedere che questa non legittima le sue conclusioni.

E pensare che Pappenheim dichiara di non poter accettare la mia teoria, perchè contraria alla sua !

La sua teoria, cioè la sua reazione, non poteva più validamente suffragare la mia, dimostrando lo stato cadaverico dei mononucleati entro il sangue.

PARTE II. Cesaris-Demel studiò con la colorazione a fresco quei corpi che furono trovati da Kurloff in alcuni mononucleati del sangue della cavia. Kurloff li ritenne vacuoli ripieni di secrezioni delle cellule e constatò che, ingrossandosi, potevano assumere cospicua grandezza, e che, quando avevano raggiunto circa quella delle cellule, sembravano col loro contenuto rompere l'involucro del citoplasma, abbandonando quelle. Cesaris-Demel fece le sue constatazioni ignorando il lavoro del Kurloff, del cui reperto riconobbe la priorità dopo avere presa conoscenza del predetto lavoro.

Cesaris-Demel, ritenendoli inclusi nel protoplasma dei mononucleati, crede che tali corpi siano strettamente affini per struttura e funzione alle altre granulazioni leucocitarie.

Lo studio di tali corpi è per me di essenziale importanza, perchè Ferrata, dividendo le idee di Cesaris-Demel, li identifica senz' altro ai plasmosomi delle cellule ghiandolari, ai suoi corpi plasmosomici dei mononucleati, e ne fa gli indici di una attiva funzione secretoria dei mononucleati. Questi adunque per tali corpi mostrano di essere viventi e validamente funzionanti entro il sangue. Quindi niente affatto cadaveri cellulari, come li affermai già nel mio lavoro dello scorso anno, prima delle suesposte costatazioni, dimostrando lo stato cadaverico di tali elementi entro il sangue!

Cesaris-Demel esclude la natura parassitaria di tali corpi per ciò che si trovano, più o meno numerosi, nel sangue di tutte le cavie e per ciò che queste si mostrano sane.

Prima di esporre le costatazioni specifiche dimostranti che tali corpi null' altro sono che dei protozoi (infusori) flagellati, dirò che per varie considerazioni e per altre constatazioni non mi parve troppo fondata l' esclusione di una natura loro parassitaria per ciò che dette cavie stanno bene.

1. Che le granulazioni di detti corpi, le quali vengono messe in evidenza esclusivamente colla colorazione vitale, non siano da identificarsi con quelle dei polimorfi è mostrato dal fatto che queste, mai presenti nelle predette colorazioni, appariscono nei preparati fissati. In que-

sti, come presto si vedrà, comparisce nei corpi di Kurloff-Demel qualche altra cosa.

2. Le granulazioni dei corpi in questione modificano il brillant cresyl bleu in modo da togliere quasi del tutto ad esso la specifica proprietà del dicroismo. Questo invece è spiccato nelle pallottole del protoplasma (morente) dei mononucleati e dei polimorfi. Queste si imbevono, adunque, passivamente di tale colore.

3. Il variare del comportamento morfologico di tali corpi verso i vari colori, mentre quelle dei polimorfi dànno sempre l' immagine di granulazioni con reazione costante verso i specifici colori.

4. L' essere tali corpi, non di rado, spiccatamente epiglobulari: ciò che si mostra bene specie nei preparati fissati. Colorando intensamente il citoplasma dei mononucleati, forniti di tali corpi, si vede che questi, per la loro intensissima rifrangenza, mascherano il sottoposto citoplasma: e ciò non avrebbe luogo se fossero inclusi in questo.

5. L' avere essi forma varia, specie nei preparati fissati, nei quali si presentano talora con quelle forme colle quali si mostra un leucocitozoo nel sangue dei cani, del quale prenderemo presto conoscenza.

6. Il variare del numero di tali corpi secondo la provenienza delle cavie.

7. L' avere essi grandezze oltremodo varie, essendo poi anche variabile il loro numero nei monucleati. Ne vidi cinque in un grande mononucleato, tutti piccoli.

8. Il trovarsene liberi, del tutto liberi, oppure accanto ad un nucleo, in via di istolisi, senza traccie o con poco residuo di citoplasma.

9. Il trovarne, fino dall' inizio della osservazione, senza granulazioni, così da essere del tutto simili agli altri, che infarciti di granulazioni, dopo 2-3-4 ore, vanno perdendole tutte, facendosi omogenei con un colore paglierino.

10. L' essere del tutto individualizzati, mostrandosi forniti di una membrana capsulare, nei preparati fissati, specie col calore.

11. La loro mancanza nel periodo fetale e ciò in rapporto con quanto si osserva per gli emosporidi, per i quali

come dice Marchiafava, è una legge generale la incapacità di passare dalla madre al feto.

12. La loro comparsa, abitualmente 6-8-10 giorni dalla nascita, mostra che essi sono forse in relazione, non tanto con la dieta, quanto con quelle circostanze che comandano la infezione del sangue (polimorfi e mononucleati) in altri animali per opera di protozoi affini a quelli della cavia.

13. Dimostrata la assurdità della identificazione compiuta dal Ferrata tra i suoi corpi plasmosomici (globi di protoplasma morente) e quelli di Kurloff-Demel, se questi ultimi hanno granulazioni strettamente affini a quelle dei polimorfi, era ben strano che solo alcuni mononucleati li presentassero, mentre quelle dei polimorfi esistono in tutti essi. Ed era altrettanto strano che solo nelle cavie i mononucleati avessero questo speciale potere secretorio.

Prima di esporre le mie constatazioni specifiche dimostranti che i corpi in questione sono dei protozoi flagellati, brevi parole su quanto si sa riguardo ai leucocitozoi nei mammiferi.

Bentley constatò nel febbraio 1904 nel sangue di alcuni cani (distretto di Tezpur in Assam) in alcuni polimorfi ed anche in (rari) mononucleati un corpiciattolo di cui subito sospettò la natura parassitaria. Riporto brevemente la descrizione data da Bentley per il suo reperto.

Nel sangue fissato e colorato col metodo Romanowsky, modificato da Leishmann, molti polimorfi e forme di transizione sembravano contenere uno o più corpi ovali, nucleati. Questi presentavano un contorno chiaro e un contenuto, più o meno rifrangente del protoplasma dei leucociti. Essi davano quasi l'impressione di essere contenuti in una capsula nel cui interno si poteva distinguere una *massa nucleata*, più o meno incerta. In alcuni casi questa massa suggeriva l'immagine di un verme aggomitolato su se stesso. Un diligente esame mai mancò di mostrare segni di degenerazione in questi corpi e fece escludere l'idea che essi potessero subire la digestione endoleucocitaria.

Il nucleo si presentava con marcata varietà del contorno e della sua posizione.

Una o due volte furono osservati parassiti liberi: ma

è più probabile che essi siano derivati da leucociti distrutti durante la distensione del sangue.

Molti dei leucociti, in apparenza non attaccati, mostravano una piccola massa circolare, intensamente tinta, giacente vicino al nucleo, al quale sembrava attaccata da una specie di coda, debolmente tinta.

Questo ultimo corpo, la cui natura non è evidente, può forse provare di essere uno stadio prematuro della invasione parassitaria.

L' esame del sangue fresco, mostra il parassita come un corpo quasi rosso, rifrangente, che sta nel protoplasma del leucocito, alcune volte sopra ed altre ad un lato del nucleo.

In una osservazione posteriore, nel maggio 1904, esaminando il sangue fresco di tale cane, insieme al capitano medico James (cui Bentley aveva mostrato il parassita) si costatò un piccolo verme, che era riuscito a liberarsi dalla sua capsula e che si invigilò per qualche tempo.

Esso mostrava da lato a lato un movimento di una estremità sopra la quale si vedeva una macchia marcatamente rifrangente.

Il parassita nel sangue secco, è lungo 8 - 10 μ, largo 4 o 5 ed il suo nucleo ha il diametro di 2 o 3 μ.

Il nucleo è talora centrale, talora vicino a una estremità.

Un'alta autorità, cui Bentley mostrò i suoi preparati, giudicando dalle sue affinità morfologiche, ritiene possibile che il protozoo appartenga alle emogregarine.

Termino col dire che Bentley constatò nel sangue dei cani ospitanti il parassita delle emazie nucleate e costatò che questi, lievemente anemici e con piccole elevazioni termiche, non presentavano altri fenomeni morbosi.

Gerrard trovò in un canino randagio, con esami giornalieri, in tutte le ore, un organismo incistato in un numero considerevole di polimorfi, e in rare occasioni costatò pochissimi di tali corpi, simili a cisti, liberi nel plasma. Il cane era in poco buona salute, essendo magro, emaciato, ed irregolarmente febbricitante. Gerrard però non intende affermare che questi fenomeni fossero in rapporto col parassita. Questi corpi sono oblunghi, con un contorno regolare, incolori, immobili e senza pigmento. Colorandoli col metodo Leishmann può prontamente

essere messo in evidenza un nucleo, un protoplasma ed una capsula. Il nucleo talora è a ferro di cavallo, talora regolarmente sferico, misurando 11-12 μ di lunghezza per 4,2-5,2 μ di larghezza. L' autore afferma il suo parassita sembrargli identico a quello di Bentley e James.

Gerrard comunicò di essere riuscito ad infettare uno di due cagnolini sani, senza leucocitozoi, messi in convivenza al suo. Questo aveva molte zecche e nel cagnolino che divenne infetto ne fu trovata una.

Questo reperto suggerisce all' autore l' ipotesi che le zecche possano essere i trasmissori della infezione. La madre dei cagnolini non era infetta. Nel contenuto intestinale delle zecche (Ixodes ?) che vissero sul primo cane si sarebbero trovati i parassiti.

Gerrard mandò i suoi preparati a Patrick Manson ed a Wenyon e ne ebbe confermate le più essenziali sue conclusioni. Tolgo dal rapporto di Wenyon quanto interessa per gli obbietti miei.

Il materiale delle cisti del parassita, rassomiglia a quello delle spore dei coccidi, sebbene non sia così spesso ed impenetrabile dai colori, ed è di una struttura resistente.

Il protoplasma, che riempie quasi sempre completamente la cisti, si colora più intensamente alla periferia della cisti che al centro. Esso non presenta alcuna struttura salvo alcuni granuli che si colorano intensamente e sono messi in evidenza dal liquido di Giemsa.

Il nucleo, che è colorato intensamente in rosso incarnato dalla fucsina carbolica, è di solito posto ad un polo del parassita e nel più dei casi foggiato ad U. In altri casi è irregolarmente sferico, o posto lungo un lato, come un corpo allungato e può essere quasi diviso in due parti, le quali sono sempre riunite da cordoni di materia nucleare. Il nucleo ha una struttura reticolare, e contiene alcuni granuli intensamente colorati : non si trova mai nucleolo.

Preparati di sangue del cane di Bentley, furono mandati dal dott. James alla predetta scuola e quivi furono colorati col Giemsa.

Il protoplasma del parassita si mostrò colorato in bleu pallido con granuli rossi sparsi in esso, più concentrati in un polo del parassita. Al polo opposto trovasi il nucleo

che nel più dei casi è irregolarmente sferico e compatto. In alcuni il nucleo è foggiato ad U: assenti i nucleoli.

La somiglianza fra il parassita di Bentley con quello di Gerrard è strettissima; le piccole differenze riguardano i granuli del protoplasma e la forma del nucleo.

Manson e Venyon classificano i due parassiti fra le gregarine.

James in una occasione costatò l'uscita di un parassita da un leucocita. Esso restò vicino a questo ed eseguì lenti movimenti gregariformi per qualche tempo.

Ho riportato tutti questi dettagli perchè, come si vedrà ben presto, essi corrispondono a non pochi di quelli dei protozoi del sangue delle cavie.

Qui non posso tacere che dei predetti lavori venni a conoscenza quando già avevo raccolta così ricca serie di fatti da dimostrarmi in modo assoluto la natura protozoaria dei corpi di Kurloff-Demel.

Fu per ciò con viva compiacenza che appresi i risultati di Bentley, James e Gerrard.

E quali sono le prove specifiche della natura protozoaria dei corpi di Kurloff, Cesaris-Demel?

I. Si prendano dei ciuffi di indivia, da orti inaffiati con acqua stagnante, e, dopo averli tagliuzzati, si mettano a macerare in poca acqua di pozzo alla temperatura dell'ambiente (+ 16°, + 18°) e ciò per 6, 8 o più giorni, collocando poi il recipiente al freddo, per moderare l'ulteriore sviluppo di germi.

In capo a tale tempo si aspira, previa agitazione del liquido, una poca quantità di esso fino a riempire l'ordinario tubetto della centrifuga. Si disaggrega bene il sedimento, ottenuto con la centrifugazione, a mezzo di un bastoncino di vetro e si pone una piccola goccia del sedimento su un coprioggetto. Questo poi viene posato su un portaoggetti, sul quale si stese una goccia di tenue soluzione alcoolica di brillant cresyl bleu.

Se si ebbe la fortuna di ottenere dalla macerazione dell'indivia lo sviluppo abbondante anche di protozoi, si vede, fino dall'inizio dell'osservazione, che molti di questi, forniti di magnifici flagelli, presentano delle granulazioni più o meno rotonde e grandi, tinte in bleu intenso, quasi

del tutto prive di dicroismo. Queste granulazioni si presentano molto identiche a quelle dei corpi di Kurloff-Demel nei mononucleati del sangue della cavia, con la colorazione a fresco a mezzo del brillant-cresyl-bleu.

Non di raro, taluni protozoi, quando, avendo rallentati i loro vorticosi movimenti, si sono fatti del tutto sferici, acquistano una tinta celeste nel loro plasma, che si mostra, talora, del tutto infarcito delle suaccennate granulazioni. Ed in tale stato la loro identità con i corpi predetti di Kurloff-Demel è delle più spiccate.

In molti di essi, appena iniziata l'osservazione, si vede il nucleo, tinto in viola, che si differenzia nettamente dalle granulazioni bleu-intenso, non dicroiche, disseminate nel loro plasma. Ma in taluni di essi, quando è cessato ogni loro movimento, non si vede più nè il nucleo, nè il nucleolo, e così la identità loro con i corpi di Kurloff-Demel è veramente assoluta.

A quanti colleghi della Facoltà, della quale mi onoro di far parte, ho fatto vedere questi protozoi dell'indivia e della cavia, con la colorazione a fresco col cresyl-brillant-bleu, tale identità apparve assoluta, fossero essi grandi o piccoli.

Specialmente esaminando, 1-2 ore dopo allestito, il preparato con i protozoi dell'indivia si può trovare in essi le più caratteristiche figure che si vedono (sempre con detta colorazione al cresyl-brillant-bleu) nei mononucleati delle cavie.

Dopo 4-6-8 ore tali protozoi perdono alquanto rapidamente le loro granulazioni, e si mostrano immobili, come sfere rilucenti, tinte in giallo paglierino o celeste. Ed anche in ciò essi si rivelano del tutto identici a quelli della cavia, i quali, come dissi sopra, vengono a perdere tali granulazioni, che, ad un dato momento scompariscono, in 8'-10', sotto gli occhi, restando come sfere rilucenti, omogenee, di un colore paglierino, lievemente celeste. Non mi soffermo in ulteriori dettagli sui fatti veramente magnifici che si vedono in tale osservazione.

A me basta affermare che questa ci fa vedere in taluni protozoi flagellati, dell'indivia, tuttociò che si vede nella predetta colorazione nei corpi di Kurloff-Demel.

Mettendo il coprioggetti con la goccia del sedimento, ottenuto dalla centrifugazione dell'acqua di macerazione

dell' indivia, su un portaoggetti, sul quale fu estesa ed evaporata la goccia di soluzione alcoolica di rosso neutro, si vede in non pochi protozoi (flagellati) nè più nè meno di quanto si costata nei corpi di Kurloff-Demel, parimente trattati.

Si osservano protozoi con il blocco rotondo, rapidamente spostantesi in causa dei loro vivacissimi movimenti, tinto in un bel colore mogano, del tutto simile a quello dei corpi dei mononucleati in questione.

Ma, come in questi non è sempre tale blocco che si presenta, mentre si vedono in essi altre figure, tinte nel predetto colore, e queste si vedono ripetute nei protozoi dell'indivia.

E qui, senza voler fare affermazione perentoria, parmi di potere asserire che le figure tinte, tanto nei protozoi dell'indivia come in quelli della cavia, dal rosso neutro, arieggiano alquanto le magnifiche e spiccate figure nucleari che in essi si vedono tanto nettamente, quando fissate, specie col calore.

Colorando, sempre col solito metodo, i protozoi dell'indivia col bleu di metilene, non si vedono in essi quelle figure di filamenti bleu che osservansi, quasi come reperto unico, nelle figure di Cesaris-Demel, nei corpi dei mononucleati della cavia colorati a fresco col bleu di metilene. Tali filamenti, fortemente colorati in bleu, che, secondo Cesaris-Demel, sarebbero dei cristalli, sono ben lontani dal costituire l'esclusivo reperto nei predetti corpi.

Dallo esame di molte dozzine di disegni di essi, posso desumere che le figure lineari sono rare di fronte alle altre, e che talora i fili sono ad ansa, chiusa od aperta, e che spesso i fili hanno le estremità ingrossate, come a clava. Non pochi corpi, fino dall' inizio dell' osservazione, si trovano del tutto omogenei, con un plasma rilucente tinto in giallo verdiccio e tali si mantengono durante l'osservazione.

Molto più frequenti sono quelli che hanno dei bastoncini, un pò grossi e corti, fortemente tinti in bleu, che si rivelano costituiti da blocchicini, fortemente serrati. Non di raro questi, anzichè essere allineati, sono isolati o raccolti in ammassi.

Sono sopratutto nei protozoi dell' indivia queste ultime figure che prevalgono e così si mostrano identiche a

quelle delle cavie. E per mostrare sempre più tale identità, dirò che anche in quelli dell'indivia non pochi, nell'inizio della osservazione e durante di essa, si mostrano del tutto omogenei, giallo-verdicci, come appunto nel sangue della cavia. Fatto questo che io credo di interpretare con la azione tossica dispiegata dal bleu di metilene sui protozoi, i quali perciò vengono ad esser paralizzati nei loro poteri biochimici, e non presentano più le secrezioni tingentesi col bleu di metilene.

Infatti esaminando la goccia del sedimento della macerazione d' indivia, colorata a fresco con detto bleu, si resta sorpresi della immobilità dalla quale sono colpiti non pochi protozoi, che con le altre colorazioni si presentano sempre tutti in preda a vivacissimi attivi movimenti.

II. **Fatti attinenti ai protozoi nei mononucleati della cavia colorati a fresco.**

1° Insistendo con speciale tenacia nella osservazione attenta dei preparati di sangue di cavia colorati a fresco col cresyl-brillant-bleu, mi fu dato di vedere, una volta, un corpo di Kurloff-Demel del tutto libero, fornito di due lunghi flagelli, in preda a movimenti abbastanza vivaci. Lo trovai dopo 2 ore che esaminavo il preparato lutato con paraffina (senza tavolino riscaldabile) tenendo fissa la mia attenzione per più minuti sui mononucleati, aventi il parassita. Esso era di media grandezza, poco più di un'emazia, e presentava nel suo plasma verdiccio 8 blocchicini bleu. I movimenti dei flagelli non riuscivano a spostare il corpo cellulare del protozoo. Con i miei assistenti dottori Corsini e Bizzarri, presenti in laboratorio alle 9 di sera, si costatò la permanenza dei movimenti di tali flagelli per 35'. Durante tale tempo questi perdettero di vivacità, finchè rimasero immobili; ma prima che ciò accadesse vidi scolorarsi abbastanza rapidamente le granulazioni e scomparire del tutto. Venti minuti dopò che i flagelli rimasero immobili cominciarono essi a disaggregarsi in fini granulazioni rilucenti, e dopo un'ora erano del tutto inapprezzabili, mentre il corpo cellulare si mostrava rotondo di un colore paglierino, molto rifrangente.

2° In un' altra osservazione, mentre mi trovavo in questa da oltre un'ora, vidi un corpo di Kurloff-De-

m e l, con sei granuli nella sua metà di destra, giacente sul plasma di un mononucleato medio. Sul nucleo di questo, abbastanza colorato, si vedeva un continuo movimento indistinto di qualche cosa di rilucente, e tratto tratto dal bordo citoplasmatico, circondante il nucleo, emergeva, come guizzo, un flagello. Continuando nell' osservazione, per altra ora, mi fu dato di costatare, per 2 volte, che il corpo cellulare del protozoo compì un movimento di rotazione sul suo asse. Per effetto del primo movimento i granuli si mostrano a sinistra, e per il secondo vennero a trovarsi nella metà inferiore. Avendo compagni nell' osservazione il dott. C o r s i n i e il laureando F e r u g l i o, poterono essi costatare la dislocazione dei granuli, attestante quella del rispettivo corpo cellulare.

I flagelli del protozoo, in tale caso, erano impigliati sopra il nucleo del mononucleato, dal quale riuscivano talora a svincolarsi, mostrandosi talvolta fuori dell' orlo citoplasmatico. E due volte, l'energia dei loro movimenti riuscì ad imprimere un moto di rotazione al corpo del protozoo.

3° In altra occasione, avendo per compagno nella osservazione, fatta col tavolino riscaldabile, il mio aiuto, dott. M a n c i n i, si vide un corpo K u r l o ff - D e m e l sopra il nucleo di un mononucleato medio, mostrandosi per un bel terzo della sua larghezza fuori del contorno di detto nucleo. Avendolo tenuto in osservazione per due ore e mezzo, si vide il protozoo venire sempre più a protrudere dal predetto nucleo, così da esserne fuori per circa due terzi del suo corpo. Nel mentre ciò accadeva, questo presentò uno strozzamento bilaterale, verso il punto di congiunzione del suo terzo superiore col medio. Da tale strozzamento, che andò accentuandosi, derivò una specie di segmentazione del primitivo corpo in due, il superiore dei quali, tutto fuori del mononucleato, era più piccolo dell'inferiore.

In seguito i rapporti di grandezza tra i due nuovi corpi si invertirono. In questo frattempo cominciarono a sbiadirsi le granulazioni bleu, in essi esistenti, ed i due corpi si tramutarono in due sfere, rotonda la superiore, oblunga la inferiore, rilucenti, omogenee di un giallo verdiccio.

Queste si presentarono così anche dopo 7 ore.

Fu una gemmazione esogena ed un lentissimo movimento ameboide del protozoo?

Certo, nella gemmazione esogena che in non pochi protozoi dell'indivia tanto facilmente si può vedere, si constata spesso che le gemme, sempre attaccate alla cellula madre, nella colorazione a fresco, col cresyl brillant bleu, presentano anche, quantunque piccole, le solite granulazioni bleu.

Riferendomi a questi fatti, presenti nei protozoi dei mononucleati della cavia, si vede bene che essi corrispondono a quanto, come dissi sopra, fu visto, in due occasioni, da James per il leucocitozoo di Bently.

III. **Fatti attinenti ai protozoi nei mononucleati del sangue dalle cavie, fissato col calore o con reagenti chimici.**

1° I protozoi sono epiglobulari?

Basterebbe il solo fatto della constatazione di flagelli mobili, in questi protozoi, quando sono nel mononucleato, per dimostrare che essi non si trovano entro questo. Guardando attentamente nei preparati colorati a fresco col cresyl bleu, si vede bene che talora, sebbene raramente il protozoo è sopra il nucleo del mononucleato e che, essendo sul plasma di questo, non di raro ne sorpassa il bordo libero. Se nucleo e plasma dell'elemento sono riusciti intensamente colorati, la costatazione netta delle granulazioni bleu nel plasma, molto rifrangente e debolmente tinto in verdiccio, del protozoo, mostra chiaramente che questo non è coperto dalla pagina superiore bleu del plasma del mononucleato. Anzi è la grande rifrangenza del corpo del protozoo che maschera l'intensa tinta di tutto lo spessore di detto plasma.

Osservando i protozoi dell'indivia, colorati a fresco col cresyl bleu, accade di vedere che taluni di essi in stato di attiva gemmazione esogena, mostrano talora delle gemme che, con o senza granuli, avendo acquistata anche cospicua grandezza, durante i movimenti attivi loro e della cellula madre, il cui corpo è intensamente colorato in bleu, vengono a mettersi su questo. In tale caso l'intenso colore bleu del corpo della cellula madre è, più o meno totalmente mascherato dalla spiccata rifrangenza della gemma che a quella è venuta, momentaneamente,

a sovrapporsi, mostrandosi perciò come un vacuolo (più o meno grande secondo la grandezza della gemma) bianco, rilucente nel predetto corpo della cellula madre. Ove non arriva la gemma permane spiccato il colore del corpo della cellula madre: questo ricompare subito quando la gemma è scivolata giù.

Nella infinita folla di elementi della meravigliosa fauna e flora, presentata dal sedimento della macerazione dell'indivia, accade di trovare degli enormi protozoi con attiva sporificazione endogena. Si fissino dei preparati ottenuti da tale sedimento sopratutto col calore, e colorati intensamente (ottima la fucsina carbolica) e si vedrà come si mostrino in questi elementi i protozoi inclusi in essi. Attraverso il colore intenso del plasma questi si vedono come globicini un pò rilucenti, un pò meno colorati, ma mai presentano quella rifrangenza, quel bianco rilucentissimo che si vede nei protozoi a gemmazione esogena, sovrappostisi al corpo della madre, intensamente colorato. In questi preparati è facile assai il confronto degli aspetti, radicalmente diversi, con i quali si presentano i protozoi endo- ed epicellulari.

È nel sangue fissato, che, sopratutto per moltissimi mononucleati, si dimostra in modo facile la natura epiglobulare dei protozoi. Ed a proposito della fissazione del sangue qui ripeto che i risultati, specie per lo studio dei più minuti dettagli del nucleo di tali protozoi, ottenuti con la termica invano si domanderebbero a tutte le altre fissazioni chimiche.

In questo sangue, fissato a + 120 per 10', colorato col bleu di metilene, con la pironina, ma meglio di tutti con la fucsina carbolica, dalla quale si può ottenere una rilevante colorazione rossa del nucleo e citoplasma dei mononucleati, si vede bene molto spesso che i protozoi sono assolutamente epiglobulari. Con la loro spiccata rinfrangenza mascherano l'intenso colore di tutto lo spessore del plasma, dell' elemento di cui sono ospiti. Essi si vedono come rilucenti vacuoli, del tutto incolori, circondati dalla forte tinta del plasma del mononucleato.

Se fossero inclusi in questo si presenterebbero quali vedonsi nei grandi elementi del sedimento della macerazione dell' indivia. Se fossero inclusi non si potrebbero certo rilevare, e tanto facilmente, tutte quelle fini ed ele-

ganti particolarità attinenti al loro nucleo, delle quali ben presto prenderemo conoscenza.

E guardando bene tali preparati, concentrando l' attenzione su quei mononucleati che non presentano il protozoo epiglobulare, si vede che talora esso è sottoglobulare, cioè attaccato alla loro pagina inferiore. Sarebbe stato ben strano che in tutti questi elementi il protozoo si fosse presentato esclusivamente nella loro pagina superiore. Orbene, quand'esso è nella inferiore, lo si intravede attraverso lo spessore del plasma, intensamente colorato, di cui è ospite; e lo si vede come presentasi nelle spore endogene delle grandi cellule della indivia. Ma in tale caso si riesce a rilevare, in modo molto confuso, la struttura cromatinica, quando presente, perchè mascherata dal plasma, dal quale è totalmente coperta.

2° Nucleo e sua struttura nei protozoi dei mononucleati del sangue della cavia e nei protozoi dell' indivia (1).

Quando penso che P. Manson e Venyon giudicarono, ed a ragione, come dissi sopra, della natura protozoaria (emogregarine) dei corpi trovati da Bently, da Gerrard nei leucociti (polimorfi e mononucleati) di alcuni cani, basandosi nell'esclusivo reperto di una struttura cromatinica in essi, posso dire che, anche senza tutte le suesposte prove specifiche, le costatazioni che quì espongo sono esuberanti per affermare la natura parassitaria dei corpi di Kurloff-Demel.

*Strana cosa a dirsi, veramente incredibile, il Ferrata fece delle prove con l' ematossilina ferrica per vedere se gli riusciva mettere in questi in evidenza un reticolo cromatico. Ma, come era prevedibile (dice egli), le sue ricerche furono vane!*

---

(1) I miei preparati relativi a questi nuclei, quelli relativi alla colorazione a fresco, col cresyl bleu, col rosso neutro, dei protozoi della cavia e dell'indivia, furono oggetto di attento esame da parte dei proff. Rina Monti, Bianchi, Centanni, Ruffini, Bandi, Simonelli, dott. Vitali etc., nella seduta del 26 gennaio 1907 all'accademia dei fisiocritici (vedi atti). Questi egregi colleghi, molti dei quali notoriamente assai competenti nello studio della fina istologia degli elementi, della protistologia e della batteriologia confermarono tutte le mie costatazioni.

In qualunque modo fissati questi corpi, colorati col bleu di metilene, con la pironina, con la fucsina carbolica, essi presentano dei nuclei di un' evidenza fenomenale.

La struttura nucleare è molto variabile nei singoli protozoi, tanto della cavia che dell' indivia. Ciò ben corrisponde alle attività biologiche di questi elementi, nei quali il nucleo non può presentarsi sempre con quella costante uniforme strutturale, che è presentata dagli elementi fissi dei tessuti. Quando si pensa che il nucleo della fibra muscolare contratta è diverso da quella della fibra in riposo, si comprende come i nuclei di questi protozoi, nei quali alacri atti vitali si succedono con rapidità enorme, non possano, non debbano avere sempre l'identico aspetto morfologico.

Non mi dilungo a descriverne qualche imagine: dirò solo che dalla massa nucleare omogenea diffusa, occupante o no tutto il plasma, si va al delicato budello nucleinico, che Carnoy generalizzò anche per gli infusori. Budello nucleinico che Fabre Domergue cercò invano nel *Balantidium elengatum*, fissato con l'acido osmico, avendo invece trovato soltanto delle granulazioni, così che non ritiene esatto il concetto di un budello e di un reticolo in nuclei allo stato di riposo. Ho dei preparati, fissati a + 120 e colorati col bleu di metilene, che mostrano nei nuclei di tali protozoi una struttura filamentosa, veramente mirabile, così da dare al nucleo uno aspetto areolare, senza punti nodali, assai spiccato. Ma quali altri tipi strutturali nucleari, più marcati più grossolani in tali protozoi della cavia e dell' indivia? I miei fotogrammi dimostrano questi tipi con una evidenza eccezionale e quelli dei protozoi dell'indivia, fissati a + 120 e colorati col bleu di metilene, fanno vedere delle figure nucleari del tutto simili a quelle dei protozoi della cavia.

Struttura filamentosa a gomitolo o arborescente, granuli cromatinici disseminati o raccolti a blocchi, offrenti le più varie imagini, triangolari, rotonde, quadrangolari, ad U, ad O, a T, centrali o periferiche, a cromatina diffusa, etc., ecco la grande varietà del tipo nucleare nei protozoi della cavia. Varietà che è facile costatare nei protozoi dell'indivia, taluni nuclei dei quali, come dissi, sono del tutto identici a quelli della cavia.

Insistendo nella colorazione, specie con la fucsina carbolica, previa fissazione al calore, tutto ciò è facilmente rilevabile anche dal meno esercitato osservatore. E tipi nucleari degenerativi è dato di trovare nei protozoi della cavia, segnalati dalla diffusione della cromatina, entro la quale si vedono dei vacuoli.

Si badi che se insisto nella preferibilità della fissazione termica per mettere in evidenza le suesposte strutture nucleiniche, dico subito che esse si vedono bene, per quanto meno distinte, con tutti gli altri fissatori chimici.

Ciò dico perchè non si sa mai se alle volte qualche critico non possa saltare fuori con l' obiettarmi che tali strutture cromatiniche sono effetto della fissazione termica !

Ma basta per ora di tali strutture del nucleo di questi protozoi.

Ho trovato altri fatti, molto importanti, che da soli mi autorizzano ad identificare, nel modo più assoluto i protozoi della cavia con quella dell'indivia.

Guardando anche superficialmente questi protozoi nei preparati, sempre fissati con il calore o con l' alcool etilico, metilico, assoluti, con il *Nikikoroff* e colorati col bleu di metilene, specie se la colorazione non fu eccessiva, si vede che il loro nucleo, sia diffuso o con struttura bene definita, si presenta con un colore paonazzo.

E' questo un fatto di rilevante metacromasia, presentato in modo identico dai protozoi della cavia e della indivia. Taluni figure nucleari, studiate dal dott. Moriani, valoroso allievo del compianto prof. Ziegler, nei miei preparati colorati col predetto bleu, gli fecero dire : sembrano nuclei tinti dalla tionina. Tale metacromasia è ben poco o niente affatto sensibile nei preparati fissati con le miscele osmiche.

Si colorino questi preparati con la pironina e si vedrà che mentre nel sangue i mononucleati si tingono in rosso cinabro, i nuclei dei protozoi presentano spesso un colore oro vecchio, che si accentua quanto più intensa la colorazione, fino ad arrivare al colore mogano chiaro. Colore identico viene presentato dai nuclei dei protozoi della indivia : vecchio oro che, a colorazione intensa, si tramuta in mogano chiaro.

Adunque altra metacromasia, trovata da me, veramente bella ed intensa, esercitata dalla cromatina dei detti protozoi (cavia, indivia) verso la pironina.

Si colorino questi preparati con la fucsina carbolica (allungata con 2 parti di acqua) e si vedrà che non di raro i fili, i blocchi cromatinici, tinti in rosso, presentansi su un fondo giallo oro vecchio; ciò che, in modo identico si presenta nei protozoi dell'indivia. Ed in questi preparati, specie avendoli tenuti per 40'-50' m. nella detta diluzione di fucsina carbolica, si vedono magnifici i predetti tipi nucleari, tinti in rosso acceso. In essi si vede ciò che vide Manson nei leucocitozoi di Bentley.

Si colorino tali preparati col *Giemsa* (una goccia per ogni cmc. di acqua) per 6-8-10 m. e si vedrà saltare fuori nel nucleo di questi protozoi, tanto dell'indivia come della cavia, il III colore, che con la colorazione Romanowschy si presenta nella cromatina dei parassiti della malaria. A debole colorazione il nucleo dei protozoi si presenta tinto in rosso-viola brillante e si vedono bellissimi dei sottili filamenti nucleinici, a matassa, o arborescenti (1), oppure fine granulazioni o blocchicini tinti in rosso, mentre il plasma dei mononucleati è celeste intenso ed il nucleo bleu-violaceo. A colorazione più forte il nucleo dei protozoi appare rosso-viola, mentre vi sono accentuate le tinte delle predette parti dei mononucleati, dalle quali si differenzia nettamente quella del nucleo del protozoo. Anche con tale colorazione si vedono le più svariate strutture nucleari, fino ad avere quella di una diffusione omogenea (rosso-viola) della cromatina.

Se si colora un preparato di sangue di cavia, fissato con il liquido di Hermann, previo asciugamento all'aria e ciò allo scopo di avere distesi bene i mononucleati in tutta la loro ampiezza, con il *Giemsa*, un pò a lungo (25 m'), il nucleo dei protozoi si presenta di un magnifico colore bordò vivace, che contrasta spiccatamente col colore celeste e bleu del cito e carioplasma dell'elemento ospitante il protozoo.

---

(1) Talune di queste magnifiche figure destarono nel prof. Ruffini l'impressione che rappresentino dei fatti di movimento iniziale (spirema) del nucleo.

3° Flagelli nei protozoi del sangue della cavia fissato con mezzi fisici o chimici.

Prima di esporre quanto attiene allo studio di questi flagelli dirò che non di raro i protozoi della cavia fissati col calore o con l' alcool metilico, etilico, etc., mostransi con una forma del tutto analoga (quadrata con i lati arrotondati) a quella descritta da Bently per il suo leucocitozoo. Ho un fotogramma in cui il protozoo, con tale forma, stando sopra il nucleo dell'elemento ospite, ne maschera, causa la sua alta rifrangenza, per 2[3 della lunghezza di questo, l' intenso colore.

Il plasma dei protozoi della cavia è impenetrabile a qualsiasi colore. Ho tentato le più varie colorazioni, non esclusa quella dell' emateina Apathy, dell' ematossilina Ehrlich, dell'eosina, anche per più ore di seguito, ma senza alcun risultato. E neppure la capsula loro, che si vede specie nei preparati fissati col calore assume qualsiasi colore. Molto spesso, con le predette colorazioni, tutto il corpo del protozoo appare colorato, ma è una colorazione metacromatica con stato diffuso della cromatina.

Esaminando con molta attenzione i predetti preparati in qualunque modo fissati, migliori sotto tutti i rapporti quelli col calore, si vede nel nucleo, non raramente, una fine particolarità, che consacra la dimostrazione dei flagelli in tali protozoi della cavia. E ciò in piena armonia con quanto dissi essere stato visto da me, dai miei assistenti, nel sangue colorato a fresco col cresyl bleu brillant.

Specie colorando intensamente tali preparati con la fucsina carbolica (diluita con 2 parti d' acqua) per 40'-50', si vedono i nuclei intensamente tinti in rosso. Dal loro contorno non di raro si vedono staccarsi uno o due filamenti, sottili, dello stesso colore della cromatina, che attraversano tutto lo spessore del corpo del protozoo. In questi preparati non si possono seguire più oltre tali filamenti, causa l' intensa colorazione dei mononucleati, sui quali trovasi il protozoo.

Ho dei fotogrammi che fanno vedere molto chiaramente questi fatti veramente importanti: e tali fotogrammi compariranno nel mio nuovo lavoro.

Ma cosa sono questi fili cromatinici?

Niente altro che il prolungamento della sostanza nu-

cleinica, che va a costituire il flagello, che, come ben si sa, spesso è dato da un filamento di cromatina circondato da un alone, più o meno grosso, di protoplasma.

Ed appunto per ciò, avendo talora questi flagelli, come loro parte integrale, un prolungamento della cromatina metacromatica, nella colorazione al bleu di metilene non rare volte nei miei preparati mi fu dato di trovare tali filamenti, del tutto metacromatici (paonazzi), sul plasma del mononucleato, dal quale, colorato in celeste pallido, nettamente si differenziavano per il loro colore paonazzo. Nei preparati colorati colla pironina tali fili, decorrenti sul plasma incoloro, rifrangentissimo, del protozoo e su quello rosso dell' ospite mononucleato, si distinguevano bene per il loro spiccato colore, giallo oro vecchio.

Taluni di questi preparati furono attentamente esaminati, nel mio laboratorio, dal Prof. Simonelli, aiuto nella locale clinica dermosifilopatica, ben pratico nello studio dei protozoi, essendo stato uno dei primi tra noi ad occuparsi di quello della sifilide. Egli mi autorizzò ad affermare che rilevò bene la esistenza di veri flagelli spettanti al protozoo ospite dei mononucleati, decorrenti sopra il plasma di questi.

Quasi sempre questi flagelli, che si presentano a decorso tortuoso, serpentino, a frusta, sul citoplasma dell'ospite mononucleato, non vanno al di là dell'orlo di tale citoplasma. Ciò forse deriva da ragioni meccaniche, intrinseche alla distensione del sangue sul portaoggetti. Ho però due preparati nei quali il flagello del protozoo, emergente con la sua cromatina da quella del suo nucleo, dopo avere oltrepassato il plasma del protozoo e del mononucleato, si vede libero, con un decorso tortuoso al di là del bordo di questo, fra le emazie, oppure sopra una di queste. Tale flagello si riconosce bene per il suo colore metacromatico.

Queste sono le prove specifiche da me offerte per la dimostrazione che i corpuscoli di Kurloff-Demel sono esclusivamente dei protozoi flagellati.

I cani di Bentley, di James, di Gerrard, aventi i suddescritti leucocitozoi, mostravansi in non buone condizioni di salute. Le cavie invece, anche se molto infette, stanno del tutto bene. Nel passato dicembre mi

accadde di imbattermi in due cavie, le quali avevano oltre un terzo dei mononucleati del loro sangue con 1-2 e perfino con 5 (piccolissimi) protozoi : in onta di ciò, esse non presentavano segni di patimento alcuno.

E la ragione di ciò ?

Io credo che essa stia nel fatto che questi protozoi, parassiti nel vero senso della parola, s' attaccano ad elementi che devono scomparire dal sangue, quali appunto sono i mononucleati di questo.

Vivendo essi alle spalle di veri cadaveri cellulari, si comprende bene come l'organismo, il cui sangue li ospita, non debba risentire danno dalla loro presenza. Ciò come ben si vede, è pure un argomento a favore della mia teoria.

Forse, data la natura sferica del protozoo, il suo attecchire nei mononucleati riesce molto più agevole, perchè questi sono lamellari. Essi, pur avendo qualche spessore quando sono entro il sangue, per effetto della loro passiva imbibizione del plasma sanguigno, si prestano meglio ad ospitare il protozoo, molto meglio degli altri elementi del sangue, che sono sferici.

Comunque sia rimane dimostrato dalle mie ricerche la esistenza di un nuovo leucocitozoo, ospite esclusivo di alcuni mononucleati nel sangue della cavia.

E questo corrisponde ai corpuscoli da Kurloff e da Cesaris-Demel trovati in tali elementi.

Nel chiudere queste pagine non posso trattenermi dall' esprimere la mia alta sorpresa, rilevando, come dissi sopra, che tutto quanto finora esposi su questi protozoi, specialmente sui loro nuclei, sia completamente sfuggito alla attenzione del Ferrata. E la mia meraviglia si fa enorme, considerando che le mie costatazioni, se talora riguardano fatti minutissimi, delicatissimi, sempre però sensibili, più spesso sono di una evidenza banale.

Riguardo alle conclusioni che il Ferrata desume dalle sue costatazioni debbo essergli ben grato, perchè queste non potevano riuscire più efficaci nel convalidare la mia teoria, che considera i mononucleati del sangue come esclusivi cadaveri cellulari, derivanti dallo sfaldamento degli endoteli dell' apparato vascolare.

Infatti, i suoi corpi plasmosomici, in tali mononu-

cleati, simili, secondo Lui, ai plasmosomi delle cellule ghiandolari, questi corpi plasmosomici, testimoni della vitalità, dell' alta funzionalità (secretiva) dei mononucleati entro il sangue, sono invece i più netti ed eleganti indici del loro stato cadaverico, entro questo.

I corpi di Kurloff-Demel, identici, secondo Lui ai predetti suoi corpi plasmosomici, ai plasmosomi delle cellule ghiandolari, attestanti essi pure la vitalità, l' alta funzionalità (secretiva) dei mononucleati entro il sangue sono dei parassiti epiglobulari.

Mirabile funzione, scoperta dal Ferrata, nei mononucleati del sangue della cavia quella di secernere..... dei protozoi flagellati epiglobulari!

BIBLIOGRAFIA.

Schmaus e Albrecht. Ergebnisse der Algem. Pathol. 1896, pag. 479 a 540. — Ferrata. *Tommasi*, n. 34, 1906.— Cornil e Ranvier. Troisiéme Edition T. II, p. 516. — Jolly. *Arch. de méd. exper.* etc., n. 1, janvier 1902, III tavola. — Ferrata. Sui globuli bianchi mononucleati. *Arch. per le scienze med.*, Vol. XXX, fasc. 3, Torino 1906. — Marchiafava e Bignami. La infezione malarica. Edit. Vallardi, pag. 191. — Pappenheim. Folia haematologica. Settembre 1906. — Cesaris-Demel. Sulla particolare struttura di alcuni grossi leucociti mononucleati della cavia colorati a fresco. *Arch. per le scienze med.*, vol. XXIX, 1905, Torino. — Bentley. Preliminary note upon a leucocytozoon of the g. dog. *The Brit. med. jour.* May 5. 1905. — Gerrard. On a protozoan parasite found in polymorfonuclear Leucocytes of a dog. *The journal of Hyg.*, vol. VI, n. 3, july 1906. Report on d.r P. N. Gerrard's preparation accompanying the Foregoing Communication By E. M. Wenyon Protozoologist to the London School of tropical medicine. *The journ. of Hygiene*, vol. VI, 1906, p. 231. — L. Maggi. Tecnica parassitologica. Manuale Hoepli, Milano 1895.

# ABBONAMENTI CUMULATIVI

## PAGABILI a rate mensili per l'ANNO 1907

A) **Riforma Medica** pel 1907 (col premio del Prontuario di Posologia).

B) **Trattato completo di Terapia speciale medico-chirurgica** dei professori Penzoldt e Stintzing (opera di undici volumi interamente pubblicati). Prezzo originale L. 143. Si concede agli abbonati della *Riforma Medica* per L. 32 franco.

C) **Collezione dei Manuali** editi dalla *Riforma Medica:* Prof. G. Rummo. *Manuale di Terapia clinica,* 7ª edizione, legato in tela. — Prof. L. Ferrannini. *Manuale di Semejotica fisica e funzionale,* 1905.—Prof. G. Klemperer. *Compendio di Diagnostica.* — Prof. L. Ferrannini. *Manuale di Organoterapia, Batterio-terapia, Vaccino-terapia, Sieroterapia, Citoterapia.* — Prof. G. Rummo e Dott. G. Militello. *La Cardioptosi.*

## Condizioni degli Abbonamenti Cumulativi.

**Primo abbonamento cumulativo:** **Riforma Medica** con premio e **Trattato di Terapia.** Costo complessivo L. 53,50. — Modo di pagamento: prima rata, alla richiesta dell'abbonamento cumulativo, L. 13,50. Le residuali L. 40 a rate mensili di L. 5 a cominciare dalla fine di gennaio 1907 e così di mese in mese e senza interruzione, pagabili con cartolina-vaglia intestata all'Amministrazione della *Riforma Medica* in Napoli, ove ogni abbonato eligge il suo domicilio. Dopo il pagamento della prima rata in L. 13,50 si riceverà a rigore di posta l'intera opera del Trattato di Terapia (undici volumi) franco ed il giornale dal 1º gennaio. Il premio del Prontuario di Posologia sarà spedito dopo il pagamento dell'ultima rata e non altrimenti. *Pagando tutto anticipatamente* L. 50, *invece di L.53,50.*

**Secondo abbonamento cumulativo:** **Riforma Medica** con premio, **Trattato di Terapia** e tutta la **Collezione dei Manuali** al numero di cinque. Costo complessivo L. 81,70. — Modo di pagamento: prima rata alla richiesta dell'abbonamento cumulativo, L. 21,70. Le residuali L. 60 a rate mensili di L. 5 a cominciare dalla fine di gennaio 1907 e così di mese in mese e senza interruzione, pagabili con cartolina-vaglia intestata all'Amministrazione della *Riforma Medica* in Napoli, ove ogni abbonato eligge il suo domicilio. Dopo il pagamento della prima rata in L. 21,70, si riceveranno a rigore di posta e franco il Trattato di Terapia (undici volumi) ed i cinque Manuali ed il giornale dal 1º gennaio. Il premio del Prontuario di Posologia sarà spedito dopo il pagamento dell'ultima rata e non altrimenti. *Pagando tutto anticipatamente* L 76 *invece di L. 81,70.*

**Abbonamento annuo con premio PRONTUARIO DI POSOLOGIA del prof. L. Ferrannini: Per l'Italia L. 21,50, per l'Estero L. 37,50.**

**N.B. Inviare vaglia, corrispondenza unicamente all'Amministrazione della RIFORMA MEDICA in Napoli. Non fa bisogno di mettere altra indicazione pel sicuro ricapito.**